

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 131**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2005 E 05729831 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 1735431**

54 Título: **Método para la expansión de células madre y células progenitoras postembrionarias a partir de sangre de cordón umbilical y de inmunoterapia**

30 Prioridad:

31.03.2004 WO PCT/EP2004/003429

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.12.2015

73 Titular/es:

**IPD-THERAPEUTICS B.V. (100.0%)
Molenstraat 110, Pivot Park RE 1134-1136
5342 CC Oss, NL**

72 Inventor/es:

**SCHWARTZ-ALBIEZ, REINHARD y
PUNZEL, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 553 131 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la expansión de células madre y células progenitoras postembrionarias a partir de sangre de cordón umbilical y de inmunoterapia

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención se refiere a métodos para la expansión *ex vivo* de células madre y células progenitoras humanas postembrionarias a partir de sangre de cordón umbilical. En particular, la invención se refiere a la obtención, multiplicación y diferenciación de células madre y células progenitoras humanas postembrionarias como células inmunocompetentes para su uso como agentes inmunoterapéuticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Desde hace mucho tiempo se están investigando métodos para obtener y cultivar células madre; véase Punzel M et. al., *The microenvironment of AFT024 cells maintains primitive human hematopoiesis by counteracting contact mediated inhibition of proliferation*, CELL COMMUNICATION & ADHESION (2002), 9, 149-159; Gupta P et. al., *Human LTC-IC can be maintained for at least 5 weeks in vitro when interleukin-3 and a single chemokone are combined with O-sulfated heparansulfates: Requirement for optimal binding interactions of heparin sulfate with early-acting cytokines and matrix proteins*, BLOOD (2000) 95, 147-155; Gupta P et. al., *Artificial proteoglycan-like molecules containing heparin sulfate enhance the ability of cytokines to maintain human hematopoietic stem cells in vitro*, JOURNAL OF INVESTIGATIVE MEDICINE (1995) 43, 342A, & CLINICAL RESEARCH MEETING; SAN DIEGO; CALIFORNIA; EE. UU.; MAYO 5-8, 1995; Gupta P et. al., *Structurally specific heparin sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche*, BLOOD (1998) 92, 4641-4651; Lewis ID et. al., *Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture in a noncontact system*, BLOOD (2001) 97, 3441-3449; Moore K et. al., *In vitro maintenance of highly purified transplantable hematopoietic stem cells*, BLOOD (1991) 89, 4337-4347; Moore K et. al., *Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor like repeat motifs*, PNAS EE. UU. (1997), 94, 4011-4016; Stringer SE et. al. *Identification of an MIP-1alpha-binding heparin sulfate oligosaccharide that supports long-term in vitro maintenance of human LTC-ICs*, BLOOD (2003) 101, 2243-2245);
- 15 Theunissen et al, *Long-term engrafting umbilical cord blood cells are preserved after ex vivo culture in stroma-free culture* (en: Autologous Blood and Marrow Transplantation: Capítulo 14: páginas 599-603 (2001): Carden Jennings Publishing Co. Ltd. (ed. K.A. Dicke y A. Keating)); Schubert, M (Einfluss regioselektiv modifizierter Herapansulfate auf den Erhalt und die Expansion primitiver hämatopoietischer Stammzellen und Vorläuferzellen: Disertación inaugural para la obtención del Doctorado de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Ruprecht Karl de Heidelberg, publicada después de la fecha de prioridad).
- 20 Theunissen et. al., describen el cultivo *ex vivo* de células sanguíneas del cordón umbilical en un cultivo sin estroma. Las células sanguíneas del cordón umbilical se cultivan con heparinas sulfatadas 6-O, entre otros. Gupta et al., (1998; 2000), describe el cultivo de células de médula ósea en un sistema sin estroma junto con heparinas con contenido de azufre, entre otros. Schubert describe la influencia del herapán sulfato modificado regioselectivamente en la preservación y la ampliación de células madre hematopoyéticas primitivas y células precursoras.
- 25 ID Lewis et al. describen en Blood (2001) 97, 3441-3449 cultivos *ex vivo* con y sin contacto con células estromales para la conservación a largo plazo y el cultivo (expansión) de células presuntamente pluripotentes procedentes de sangre de cordón umbilical. Las células madre de sangre de cordón umbilical se cultivan en placas de cultivo recubiertas de colágeno, en las que las células madre están en contacto fluido a través de una membrana con células alimentadoras AFT024. Las células alimentadoras AFT024 emiten manifiestamente un factor desconocido que produce un bloqueo de la diferenciación en la expansión de las células madre. Además, describen cultivos de expansión en un medio MV8 uniforme sin estroma, que además contiene heparina N-desulfatada O-sulfatada. El cultivo en el medio MV8 sin estroma con heparina N-desulfatada O-sulfatada permite una expansión de 180 veces de las células nucleadas TNC, siendo no obstante la multiplicación de las células CD34+ o las CFC y la expansión de las LTC-IC solo de una o dos veces. En este contexto, cabe destacar que la expansión de las células CD34+ en el medio MV8 sin estroma es de solo 1,1 veces ($\pm 0,2$) después de siete días y, después de 14 días, de solo 2,0 veces, en una variación de $\pm 2,0$ (!!) (véase Tabla 2, página 3444), por lo que no se debe partir de una expansión de las células CD34+.
- 30 Las células madre multiplicadas de esta forma poseen además la capacidad, aunque limitada, de autorrenovarse y diferenciarse de forma multilineal en células mieloides y eritroides según el ensayo LTC-IC. Las células madre multiplicadas de esta forma no se pueden diferenciar en células linfáticas (células NK y NKT).

- De esta forma, la desventaja del estado de la técnica es que la expansión de las células madre y las células progenitoras es muy baja y, debido al número reducido de células, no es posible producir de este modo medios terapéuticos aplicables. Además, las células madre y las células progenitoras no se multiplican de forma que se puedan diferenciar después en células linfáticas inmunocompetentes.
- 55

RESUMEN DE LA INVENCION

El objeto de la invención es proporcionar métodos y medios para la expansión de células madre y células progenitoras postembrionarias, preferentemente de sangre de cordón umbilical, caracterizado por que, después del cultivo *ex vivo* y la multiplicación eficaz, las células se pueden diferenciar tanto en células linfáticas inmunocompetentes NK y NKT como en progenitores mieloides. Para el uso previsto de las células madre y células progenitoras como agente terapéutico, es necesario que el cultivo *ex vivo* y la expansión tengan lugar sin la presencia de células estromales ni células alimentadoras.

Este objeto se logra a través de la expansión de las células madre y células progenitoras en un medio que, además de los nutrientes habituales, contiene un glicano y/o glicosaminoglucuronanos específicamente regiomodificados, en el que, especialmente en una o varias unidades monoméricas, el átomo C₂ se encuentra acilado o acetilado y el átomo C₆ se encuentra O-sulfatado. De esta forma, un aspecto de la invención es un método para obtener y expandir células madre hematopoyéticas postembrionarias de sangre de cordón umbilical evitando una diferenciación no deseada, en el que las células iniciadoras de la sangre de cordón umbilical *ex vivo* se cultivan en un medio sin estroma en presencia de un glicano y/o un glicosaminoglucuronano regiomodificado, modificados de tal forma que el grupo lateral del átomo C₂ de una o varias unidades monoméricas de glicano y/o glicosaminoglucuronano tenga un grupo acetilo o un grupo acilo con 2 a 12 átomos de carbono; el grupo lateral del átomo C₆ de una o varias unidades monoméricas de glicano y/o glicosaminoglucuronano es un grupo 6-O-sulfato y, finalmente, la obtención de células madre y células progenitoras que pueden diferenciarse en células mieloides y linfoides. El glicano o glicosaminoglucuronano regiomodificado se selecciona preferentemente de entre α 1-4-glicanos, β 1-3-glicanos, β 1-4-glicanos, β 1-3, β 1-4-glicosaminoglucuronanos, β 1-4, α 1-4-glicosaminoglucuronanos, β 1-4, β 1-3,(α 1-3)-glicosaminoglucuronanos y β 1-4, β 1-3,(α 1-4)-glicosaminoglucuronanos. El glicosaminoglucuronano regiomodificado pueden ser un derivado de heparina esencialmente N-desulfatado y N-reactilado o N-reacilado en el átomo C₂, que posee grupos C₆-O-sulfato y que contiene un 5 % de C₃-O-sulfato. Más preferentemente, el derivado de heparina modificado de este modo regiomodificado contiene al menos un 60 % de C₂-O-sulfato y al menos un 80% de C₆-O-sulfato. El glicano o glicosaminoglucuronano regiomodificado se presenta según la invención en el medio de cultivo en una concentración de 15 a 50 mg/L.

Otro aspecto de la invención radica en que las propiedades linfoides o mieloides de las células madre y de las células progenitoras generadas de este modo se controlan en un ensayo con células iniciadoras mieloides y linfoides (ML-IC) o en un ensayo con células iniciadoras linfoides (LY-IC), y en un ensayo de cultivos a largo plazo de células iniciadoras (LTC-IC). Las células madre y células progenitoras multiplicadas bajo condiciones GMP (GMP: buenas prácticas de fabricación) también se pueden diferenciar en linfocitos funcionales (células NK y células NKT).

Un aspecto particularmente valioso de la invención se refiere a la producción de una composición terapéutica que contiene células madre y células progenitoras obtenidas y multiplicadas según la invención, preferentemente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipientes u otros diluyentes, por ejemplo para una inyección intraperitoneal, intravenosa, intratecal o de otro tipo.

Un aspecto inmediato de la invención es además un medio de cultivo para la expansión de células madre y células progenitoras postembrionarias que contienen un glicano y/o glicosaminoglucuronano regiomodificado, en el que el grupo lateral del átomo C₂ de una o de varias unidades monoméricas del glicano y/o glicosaminoglucuronano se encuentra acilado o acetilado, y el grupo lateral del átomo C₆ de una o varias unidades monoméricas del glicano y/o glicosaminoglucuronano es un grupo 6-O-sulfato, así como el uso de dichos glicano y glicosaminoglucuronano regiomodificados para la expansión de las células madre y las células progenitoras postembrionarias.

El agente terapéutico producido se puede administrar directamente para el tratamiento de enfermedades tumorales, enfermedades virales, hepatitis C, VIH, enfermedades sistémicas malignas, leucemias agudas, leucemias crónicas, síndrome mieloproliferativo (SMP), síndrome mielodisplásico (SMD), linfomas no hodgkinianos (LNH) altamente malignos, LNH menos malignos, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobunemia de Waldenström, histiocitosis X, amiloidosis y tumores sólidos como carcinoma anal, astrocitoma, basalioma, cáncer pancreático, cáncer vesical, carcinoma bronquial, cáncer de mama, carcinoma del cuerpo uterino, síndrome CUP, cáncer intestinal, cáncer de intestino delgado, cáncer de ovarios, carcinoma de endometrio, cáncer de vesícula biliar, cáncer de útero, cáncer de cuello de útero, glioblastoma, tumor cerebral, linfoma cerebral, metástasis cerebral, cáncer de testículo, tumor hipofisario, carcinoides, cáncer de laringe, cáncer óseo, tumores de cabeza y cuello, carcinoma de colon, craneofaringioma, cáncer hepático, metástasis hepática, tumor en el párpado, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, meduloblastoma, melanoma, meningeomas, micosis fungoides, neurinoma, cáncer renal, linfomas no hodgkinianos, oligodendroglioma, carcinoma de esófago, carcinoma ovárico, carcinoma pancreático, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de faringe, carcinoma rectal, retinoblastoma, cáncer vaginal, carcinoma tiroideo, cáncer de esófago, espinalioma, timoma, cáncer de uretra, cáncer de vulva, tumores de partes blandas, carcinoma de cérvix.

Otras realizaciones y aspectos preferentes de la invención se pueden deducir de las reivindicaciones, la descripción y los ejemplos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En la descripción, las "células madre postembrionarias" designan células madre somáticas, especialmente las células madre de sangre humana de cordón umbilical. Se denominan "células progenitoras" aquellas células madre recién aisladas de la sangre de cordón umbilical y no expandidas. Con la formulación "evitando la diferenciación" se entiende que, en el cultivo *in vitro*, las células madre se conservan al menos de forma numérica. La propiedad de las células madre de las células multiplicadas se comprueba y se confirma en el ensayo ML-IC, como se describe posteriormente con mayor detalle. Las células progenitoras linfoides y mieloides expandidas, generadas mediante proliferación, se cuantifican además en el ensayo LTC-IC (mieloide) y en el ensayo LY-IC (linfoide), como se describe posteriormente.

Así, un aspecto de la invención es un método para generar *in vitro* células inmunocompetentes (células NK y células NKT) mediante la expansión de las células madre y células progenitoras postembrionarias de la sangre de cordón umbilical. El método se caracteriza por que estas células se cultivan, evitando una diferenciación no deseada, en un medio que contiene un glicano y/o un glicosaminoglucuronano modificado regio- y estereoselectivamente, en el que las modificaciones son tales que este glicano contiene grupos compuestos N- y/u O-sulfato, amino, acetilo y/o acilo a lo largo de la cadena polimérica. De forma particularmente preferente, el átomo C₂ se encuentra acilado o acetilado, y el átomo C₆, O-sulfatado en una o varias unidades monoméricas. En otras palabras, en el método de la invención, las células iniciadoras de la sangre de cordón umbilical se multiplican evitando una diferenciación de forma que, por un lado, se conserven al menos las células madre y, de forma paralela, se generen células progenitoras primitivas determinadas como mieloides y linfoides. El objetivo de la multiplicación es, por tanto, que después de una división celular se obtengan dos células madre, de las que al menos se conserve una con función de célula madre, y la otra se diferencie en un progenitor definido o, en el caso de una división asimétrica, surjan una célula madre y una célula progenitora, en la que esta última se pueda diferenciar en células inmunocompetentes NK y NKT.

Este efecto de conservación de células madre o multiplicación de células madre y generación de células progenitoras se logra mediante el cultivo *in vitro* en un medio de cultivo que contiene un glicano y/o un glicosaminoglucuronano modificado, en el que el átomo C₂ se encuentra acilado o acetilado, y el átomo C₆, O-sulfatado en una o varias unidades monoméricas. Las moléculas de heparina se forman normalmente a partir de cadenas no ramificadas de componentes sacáridos sulfatados que contienen principalmente glucosamina, ácido glucurónico y ácido idurónico; cuentan con distintos pesos moleculares entre 4000 y 50.000 daltons. El peso medio de las heparinas es de 16.000 daltons. Debido a los numerosos restos de carboxilo y sulfato presentes en la molécula, la heparina tiene una carga fuertemente negativa y constituye, por tanto, complejos con proteínas básicas bajo condiciones fisiológicas. Si el glicano o el glicosaminoglucuronano modificado según la invención es un derivado de heparina, las unidades de glucosamina deben poseer un grupo 6-O-sulfato en un 80 % o más. Una 6-O-desulfatación selectiva del derivado de heparina reduce drásticamente el bloqueo de la diferenciación en la expansión de las células madre. El grupo 2-O-sulfato de las unidades de ácido idurónico tiene además importancia para el bloqueo de la diferenciación. El grupo 2-O-sulfato debería estar presente en la heparina en un 60 % o más. Una 2-O-desulfatación reduce significativamente la actividad de bloqueo. Por el contrario, los grupos N-sulfato de las unidades de glucosamina se deben retirar y sustituir por grupos N-acetilo o grupos N-acilo de distintas longitudes, preferentemente con 3 a 18 átomos de carbono, más preferentemente, con 2 a 12, y especialmente preferente, con 3 a 6 átomos de carbono. La N-desulfatación del derivado de heparina no activa ninguna actividad de bloqueo por sí sola. En el derivado de heparina, las glucosaminas deberían, además, soportar un grupo 3-O-sulfato en un 5% o menos. El peso molecular del derivado de heparina modificado es, en un caso ideal, de aproximadamente 10 kDa. Como fuente iniciadora para la producción de heparinas modificadas se puede utilizar heparina procedente de mucosa intestinal o renal porcina o bovina. Además, según la invención, también se incluyen heparinoides semisintéticos hechos de polisacáridos de origen natural. Otras fuentes de glicanos, glicosaminoglucuronanos y polisacáridos sulfatados heparinoides que, después de una modificación apropiada, presentan estructuras comparables o equivalentes, son conocidas por el experto en la materia.

La sangre de cordón umbilical es una fuente ventajosa de células madre somáticas, puesto que existen pocas o ninguna consideración ética en contra de su uso. Además, las células madre y células progenitoras postembrionarias de la sangre de cordón umbilical son ontogenéticamente vírgenes e inmaduras, lo que supone una gran ventaja para los objetivos terapéuticos perseguidos. El uso terapéutico clínico de estas células se limitaba principalmente a pacientes pediátricos con un peso corporal inferior a 40 kg debido a las reducidas cantidades de células en la mayoría de los injertos de cordón umbilical disponibles. Con el método *in vitro* conocido sin estromas, estas células madre no se podían expandir y no era posible generar con ellas suficientes células inmunoelectoras. El principal problema era la inducción de diferenciaciones incontroladas a la vez que se perdían células madre de la población iniciadora empleada.

Los experimentos realizados hasta el momento han mostrado que la sangre infantil residual que permanece en la placenta y que se puede obtener a través del cordón umbilical (CB o sangre de cordón umbilical) tras la onfalotomía contiene normalmente suficientes células madre hematopoyéticas (CMH) primitivas para conseguir también en adultos, y no solo en niños, una reconstrucción hematológica e inmunológica. El uso de CB para el trasplante de células madre en adultos se veía limitado hasta el momento, debido a la cantidad insuficiente de células

progenitoras mieloides y linfoides y, especialmente, debido a las células inmunes vírgenes, puesto que periodos de reconstrucción demasiado largos incrementan la mortalidad de forma significativa frente a los trasplantes de médula ósea. La CB ofrece precisamente la ventaja de contener una gran población de células madre primitivas con una potencia de proliferación y de célula madre aumentada. Recientemente, varios informes han demostrado que los trasplantes de células madre de la sangre de cordón umbilical resultan también ventajosos en los trasplantes alogénicos de pacientes con enfermedades sistémicas malignas: Las células madre de la sangre de cordón umbilical tienen, frente a las de la médula ósea o la sangre periférica, ventajas decisivas: i) Se pueden obtener rápida y fácilmente, sin suponer daño físico para el donante. ii) Conllevan un riesgo menor de transmisión de enfermedades virales (en particular, de citomegalovirus). iii) El riesgo de sufrir EICH (enfermedad injerto contra huésped) es mucho menor, por lo que, en resultados comparables, se pueden aceptar hasta 3 incompatibilidades HLA. Se encuentran disponibles preparados de sangre de cordón umbilical, como los llamados medicamentos terminados, completamente pretestados y almacenados y se puede disponer de ellos en un periodo de tiempo muy corto. Sin embargo, el uso terapéutico de los trasplantes hematológicos no solo se veía limitado por el pequeño número de células presentes en el injerto, sino también por la larga fase de reconstitución, que además conllevaba las complicaciones clínicas correspondientes después del trasplante. Estos problemas se pueden resolver mediante el método de la invención y los agentes inmunoterapéuticos proporcionados por la misma.

Cierto es que la actividad de las células efectoras inmunológicas de la sangre de cordón umbilical es bastante reducida en comparación con la de fuentes adultas. Pero esto también resulta ventajoso, debido a que contribuye a una baja incidencia y gravedad de la EICH. Por otro lado, esto tiene como consecuencia un aumento de la morbilidad y la mortalidad debido a complicaciones infecciosas surgidas por trasplantes de células madre de cordón umbilical. No obstante, estos problemas se resuelven igualmente mediante la generación *ex vivo* de células inmunocompetentes según la invención.

Varios estudios han demostrado que, especialmente las células NK, desempeñan un papel importante en los trasplantes alogénicos, en los que las células NK alorreactivas del donante eliminan no solo células leucémicas residuales, sino también células T y células que presentan antígenos del receptor, y participan en la resistencia a la infección inicial tras el trasplante. Estas reacciones inmunológicas se controlan mediante interacciones de los denominados "Killer Immunoglobulin-like Receptors" (receptores KIR) y los denominados receptores de citotoxicidad natural (NCR) de la célula NK del donante con determinados antígenos del complejo principal de histocompatibilidad de la clase I (CPH CI. I) de las células del receptor.

Por estos motivos, una expansión *ex vivo* con la subsiguiente maduración funcional de células progenitoras primitivas CB, especialmente con potencial de diferenciación en células NK, resulta importante para un trasplante eficaz de células madre. Para ello se deben expandir pocas células primitivas, de modo que se disponga de células progenitoras suficientes para generar un agente terapéutico clínicamente aplicable a través de una diferenciación adicional en, entre otros, células NK y NKT.

En la expansión *ex vivo* de células madre humanas de médula ósea y CB se han empleado hasta el momento en el estado de la técnica distintos aditivos de cultivo (distintas combinaciones de citocinas, capas alimentadoras de células estromales, biorreactores). En este momento, el estado de la técnica es contradictorio o no reproducible en muchos aspectos. Tampoco está claro si las células madre mantienen sus propiedades y su capacidad de diferenciarse de forma multilineal, así como de autorrenovarse en los cultivos *ex vivo* descritos para la expansión del número de células y la inducción de proliferación, ni si son adecuadas para el trasplante. Todos los sistemas de cultivo *in vitro* anteriores provocan simultáneamente una onda incontrolada de diferenciación en la proliferación de células madre. La expansión del número de células en sí misma, las características fenotípicas como CD34 o la expansión de los progenitores en el ensayo determinista lineal no ofrecen ninguna información sobre las células madre en el sentido de si después siguen siendo capaces de autorrenovarse o de diferenciarse de forma multilineal.

La dificultad radica en analizar las células madre humanas en general y, específicamente, las células madre expandidas *in vitro* teniendo en cuenta el número de células, la calidad y el grado de diferenciación. Se han establecido varios ensayos *in vitro* para analizar las células progenitoras hematopoyéticas primitivas humanas: el ensayo de cultivos a largo plazo de células iniciadoras (LTC-IC) y el ensayo de células formadoras de área en empedrado (CAFC). Junto con el ensayo de dilución limitante (LDA) permiten una estimación acerca de la frecuencia de LTC-IC o CAFC. No obstante, el problema es que después de un cultivo *in vitro* expandido, estos ensayos no permiten establecer ninguna estimación en cuanto a la capacidad de diferenciación y autorrenovación multilineal (multilínea), es decir, mieloides, linfoides, eritrocitoides y trombocitoides de las células madre primitivas aún disponibles, lo que es importante para la investigación de la efectividad del cultivo *in vitro*. La cantidad y las características de las células madre humanas se examina hasta el momento en modelos animales xenógenos muy elaborados (ovejas *in utero* y ratones NOD/SCID). Una caracterización de las células madre expandidas basada en un análisis de marcadores de superficie celular sin un examen funcional simultáneo no es lo suficientemente fiable. El modelo de ratón NOD/SCID ha mostrado que las células madre humanas expandidas *ex vivo* llevaban los marcadores de superficie típicos de las células madre primitivas, sin embargo, ya no eran capaces de autorrenovarse en el ratón SCID.

No obstante, no existen hasta el momento informes destinados a una expansión direccional y generación de células madre a partir de la sangre de cordón umbilical para su uso como agente terapéutico. Si bien es cierto que los complejos de quitosano catiónico y distintos glicosaminoglucuronanos, en particular, la heparina y el sulfato de condroitina B, pueden favorecer a la expansión de las células CB/CD34⁺ como fase sólida y añadiendo factor de células madre e IL-3, no es menos cierto que no se examinó el grado de diferenciación de las células CD34⁺. Además, se conocía que los heparán sulfatos, sintetizados de determinadas células estromales, influyen en el crecimiento y la diferenciación de células madre hematopoyéticas primitivas humanas de médula ósea (CMH-MO) y que tales CMH-MO solo se pueden obtener *in vitro*, sin la adición de células estromales y en presencia de determinados glicosaminoglucuronanos, durante un periodo de 5 semanas en hasta un máximo de un 80 %. Al mismo tiempo, solo se describió la 6-O-sulfatación de la heparina como elemento estructural esencial de la heparina que desencadena este efecto. Los efectos impulsores de crecimiento no se pudieron alcanzar con heparina N-desulfatada, N-sulfatada o no modificada, lo que destaca el efecto específico de las modificaciones según la invención. Cierto es que la heparina 6-O-sulfatada solo puede obtener células de determinación mieloide (células iniciadoras de cultivos a largo plazo; LTC-IC) a partir de médula ósea humana en hasta un 80% durante 5 semanas. Sin embargo, no se produjo al mismo tiempo una expansión de la reserva primitiva de células madre. Por otra parte, no se estudió en qué medida influyen tales heparinas y polisacáridos primitivos y células madre hematopoyéticas multipotentes en el crecimiento celular y la diferenciación en células inmunológicas terapéuticamente eficaces. La invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que ciertas modificaciones regioespecíficas en glicano y/o glicosaminoglucuronanos, así como en heparina, durante el cultivo de expansión *ex vitro* de células madre y células progenitoras postembrionarias de CB bloquean la diferenciación y, por consiguiente, permiten una subsiguiente diferenciación en células inmunocompetentes.

El método reivindicado permite la expansión de células madre postembrionarias primitivas de un pequeño número de células mediante la obtención, al menos numérica, de células madre y la generación y expansión paralelas de células progenitoras mieloides y linfoides. Mediante el método según la invención, las células madre se pueden multiplicar *in vitro* de modo que se pueda recurrir a una (re)implantación de las células expandidas, también bajo condiciones clínicas, tanto para regenerar la hematopoyesis como para sustituir específicamente órganos y tejidos. El método según la invención garantiza que se impulse la proliferación de la población de células madre de la sangre de cordón umbilical de forma reproducible mediante el uso selectivo de glicanos modificados regio- y/o estereoselectivamente, de forma que de dicha proliferación se obtengan o se multipliquen las células madre multipotentes y se expandan o se generen progenitores con determinación mieloide o linfoides a través de divisiones celulares.

Por medio de la aplicación según la invención de los glicanos o glicosaminoglucuronanos en un denominado "sistema de cultivo *in vitro* de células madre" se pueden expandir o generar células progenitoras terapéuticamente aplicables a partir de tejidos postembrionarios, que se pueden utilizar tanto para el trasplante de la sangre de cordón umbilical como a modo de agente terapéutico celular independiente para enfermedades tumorales o enfermedades virales (por ejemplo, hepatitis C o VIH). Se incluyen las siguientes enfermedades: enfermedades sistémicas malignas, leucemias agudas, leucemias crónicas, síndrome mieloproliferativo (SMP), síndrome mielodisplásico (SMD), linfomas no hodgkinianos (LNH) altamente malignos, LNH menos malignos, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, histiocitosis X, amiloidosis y tumores sólidos como carcinoma anal, astrocitoma, basalioma, cáncer pancreático, cáncer vesical, carcinoma bronquial, cáncer de mama, carcinoma del cuerpo uterino, síndrome CUP, cáncer intestinal, cáncer de intestino delgado, cáncer de ovarios, carcinoma de endometrio, cáncer de vesícula biliar, cáncer de útero, cáncer de cuello de útero, glioblastoma, tumor cerebral, linfoma cerebral, metástasis cerebral, cáncer de testículo, tumor hipofisario, carcinoides, cáncer de laringe, cáncer óseo, tumores de cabeza y cuello, carcinoma de colon, craneofaringioma, cáncer hepático, metástasis hepática, tumor en el párpado, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, meduloblastoma, melanoma, meningiomas, micosis fungoides, neurinoma, cáncer renal, linfomas no hodgkinianos, oligodendroglioma, carcinoma de esófago, carcinoma ovárico, carcinoma pancreático, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de faringe, carcinoma rectal, retinoblastoma, cáncer vaginal, carcinoma tiroideo, cáncer de esófago, espinalioma, timoma, cáncer de uretra, cáncer de vulva, tumores de partes blandas, carcinoma de cérvix.

El método según la invención se basa en la aplicación de glicanos o glicosaminoglucuronanos definidos mediante modificaciones regio- y/o estereoselectivas (descomposición, acoplamiento) de grupos funcionales laterales (por ejemplo, grupos carboxilo, sulfato, acetilo, acilo, amino), por ejemplo, a estructuras de glicano conocidas (α 1-4-glicanos, β 1-3-glicanos, β 1-4-glicanos, β 1-3, β 1-4-glicosaminoglucuronanos, β 1-3, β 1-4, α 1-3-glicosaminoglucuronanos y β 1-4, α 1-4-glicosaminoglucuronanos). Estos compuestos se definen en grupos en función de a) su masa molecular, b) su grado de patrón y sulfatación y c) la cantidad de otros grupos funcionales de los anteriormente nombrados y la división de los grupos funcionales en la unidad monomérica y a lo largo de la cadena polimérica.

Las modificaciones de los grupos laterales para su uso según la invención consisten, por un lado, en una modificación de un grupo lateral del átomo C₂ de la unidad monomérica del glicano o glicosaminoglucuronano, preferentemente, desulfatación y reacilación o reacetilación, de forma que se produzcan proporciones definidas de los grupos laterales del átomo C₂ a lo largo de la cadena polimérica. Por otro lado, la presencia de un grupo lateral

con carga negativa, preferentemente, un grupo 6-O-sulfato, en el átomo C₆ de la unidad monomérica del glicano o del glicosaminoglucuronano es un requisito estérico para el método según la invención. El porcentaje del conjunto de grupos laterales modificados del átomo C₂ y/o del átomo C₆ depende de la respectiva modificación, y el porcentaje más favorable para el método según la invención se puede determinar fácilmente mediante los ensayos nombrados en el siguiente ejemplo.

5

Estos compuestos se pueden utilizar como aditivo en cultivos de expansión y diferenciación de células madre postembrionarias para todas las aplicaciones clínicas e industriales. Una de las principales ventajas de la invención reside en el uso de sustancias químicas individuales exactamente definidas para la expansión y generación reproducible de células progenitoras postembrionarias.

10 En los experimentos que derivan en la presente invención, se obtuvieron células madre hematopoyéticas primitivas *in vitro* añadiendo polisacáridos según la invención y citocinas definidas sin el cocultivo con células estromales u otras células alimentadoras en su estado original primitivo, y se generaron al mismo tiempo células progenitoras direccionales primitivas. El potencial de diferenciación de estas células se comprobó en cultivos posteriores a niveles celulares individuales. Los polisacáridos utilizados con grupos funcionales definidos se caracterizan por su proporción definida en grupos 6-O-sulfato y grupos N-sulfato, grupos 2-O-sulfato y grupos 3-O-sulfato, así como grupos N-acetilo o grupos N-acilo. En este caso, se trata de unidades de repetición sulfatadas regio- y estereoselectivamente y acetiladas/aciladas de polisacáridos con grados de sustitución medios ajustables de distintas formas para cada grupo. Debido a la configuración de los respectivos grupos laterales con carácter variable (hidrófilo, por ejemplo, -SO₃; hidrófobo, por ejemplo, -acilo) y la división definida a lo largo de la cadena polimérica, las relaciones hidrófobas e hidrófilas del interior del glicano o glicosaminoglucuronano se modifican esencialmente.

15

20

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para la multiplicación selectiva de células madre postembrionarias, evitando una diferenciación, caracterizado por que las células iniciadoras se cultivan en un medio que contiene un glicano y/o un glicosaminoglucuronano modificado, en el que la modificación se produce de forma que se modifica el grupo lateral original del átomo C₂ de una o varias unidades monoméricas del glicano y/o glicosaminoglucuronano y el grupo lateral del átomo C₆ de uno o varias unidades monoméricas del glicano y/o glicosaminoglucuronano es un grupo lateral con carga negativa, preferentemente, grupo 6-O-sulfato.

25

Preferentemente, el glicano y/o el glicosaminoglucuronano es un α 1-4-glicano, β 1-3-glicano, β 1-4-glicano, β 1-3, β 1-4-glicosaminoglucuronano, β 1-3, β 1-4, α 1-3-glicosaminoglucuronano y/o β 1-4, α 1-4-glicosaminoglucuronano. Preferentemente, el átomo C₂ de una o más unidades monoméricas se encuentra desulfatado y en dicho átomo C₂ se introduce un nuevo grupo lateral, preferentemente, un grupo acetilo, acilo (preferentemente, butilo) amino o carboximetilo. Aún más preferentemente, un grupo acetilo o acilo. Se entiende por reacetilación el acoplamiento de un grupo acetilo al átomo C₂ de la unidad monomérica.

30

El porcentaje más ventajoso de átomos modificados respectivamente C₂ y/o C₆ se puede determinar mediante los ensayos funcionales descritos posteriormente.

35 Las estructuras básicas de hidratos de carbono empleadas para la presente solicitud consisten en compuestos como los definidos por "IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)" (Eur. J. Biochemistry 126 (1982), 439-441) y descritos, por ejemplo, por S. Dumitriu (Polysaccharides in Medical Applications, Marcel Dekker, 1996), así como J. Lehmann (Kohlenhydrate, Chemie und Biologie, G.Thieme Verlag, 1996). Al mismo tiempo, el término glicano comprende todos los oligo- y polisacáridos que, por su estructura secuencial, pueden ser tanto homoglicanos, consistentes en una unidad de repetición monosacárida, como heteroglicanos, consistentes en distintas unidades de repetición monosacárida.

40

Los oligosacáridos/polisacáridos comprenden compuestos en los que los monosacáridos se unen entre sí mediante uniones glicosídicas. Los oligosacáridos y polisacáridos con secuencias sacáridas repetitivas se engloban en este caso en los glicanos. El término "oligosacárido" designa glicanos que consisten en 2 a 10 unidades monosacáridas, mientras que el término "polisacárido" comprende todos los glicanos que consisten en más de 10 unidades monosacáridas.

45

Como glicosaminoglucuronanos se definen heteroglicanos con unidades disacáridas repetitivas que consisten en un aminoazúcar y un ácido urónico respectivamente, que se distinguen unos de otros en función de sus unidades monosacáridas y sus uniones glicosídicas.

50 Los glicanos o glicosaminoglucuronanos empleados para el método según la invención pueden presentar distintos grados de conexión y ramificación, es decir, pueden ser lineales, ramificados o cíclicos (p. ej., β -ciclodextrina), por ejemplo. Respecto a su peso molecular, los glicanos o glicosaminoglucuronanos utilizables para el método según la invención no están sujetos a ninguna limitación, sin embargo, es evidente que la actividad biológica es mejor en moléculas más grandes. Los pesos moleculares favorables son los comprendidos en el rango de, aproximadamente, 10 a 35 kD o más.

55

El experto en la materia puede, por medio de procesos generalmente conocidos, por ejemplo, mediante técnicas de grupos protectores y/o síntesis en fase sólida convencionales, producir los poli-/oligosacáridos adecuados para el método según la invención. Se conocen igualmente métodos para eliminar o acoplar cadenas laterales, por ejemplo, para la modificación regio- y estereoselectiva; véase, por ejemplo, Baumann et al., Carbohydrate Res. 308 (1998), 391-388; 331 (2001), 43-57; Baumann et al., Carbohydrate Res. 337 (2002), 1297-1307, Baumann et al., Macromol. Chem. Phys. 201 (2000), 1950-1962; patente alemana 4444445.1; Huppertz et al., en: Frontiers in Biomedical Polymer Applications (Eds. Ottenbrite, Chiellini, Cohn, Miglia Fresi, Sunamoto), tomo 2, páginas 115-129, Technomic 1999; Grootenhuis et al., Nat. Struct. Biol. 2 (1995), 736-739; Westerduin et al., Bioorg. Med. Chem. 2 (1994), 1267-1280; Wessel et al., Carbohydr. Res. 204 (1990), 131-139; Matsuo et al., Carbohydr. Res. 241 (1993), 209-215; Kurita et al., Macromolecules 31 (1998), 4764-4769; Kariya et al., J. Biol. Chem. 275 (2000), 25949-25958; Du et al., Carbohydr. Res. 329 (2000), 17-24; y Groth y Wagenknecht, Biomaterials 22 (2001), 2719-2729.

El experto en la materia también conoce métodos de cultivo adecuados y medios para poder cultivar células madre postembrionarias; véase, por ejemplo, DE 196 08 813 C2 o EP 0 695 351 B1 o el siguiente ejemplo. El experto en la materia también puede determinar la concentración óptima del glicano o del glicosaminoglucuronano modificado mediante experimentos más sencillos con la finalidad deseada. El "medio base" que incluye, entre otros, un glicano o un glicosaminoglucuronano modificado según la invención puede ser cualquier medio de los que se utilizan habitualmente para la expansión de células madre. En una forma de realización preferente del medio según la invención, el "medio base" que contiene, entre otros, un glicano o un glicosaminoglucuronano según la invención, es un IMDM ("medio de Dulbecco modificado por Iscove"; Invitrogen). Las células madre deseadas se cultivan en el medio citado anteriormente en las condiciones adecuadas, opcionalmente renovando (de forma parcial) el medio en intervalos de tiempo apropiados. El experto en la materia conoce las condiciones adecuadas, por ejemplo, con respecto a los recipientes adecuados, la temperatura, la humedad relativa y el contenido de O₂ y el volumen de CO₂ de la fase gaseosa. Preferentemente, las células se cultivan en el medio citado anteriormente en las siguientes condiciones: (a) 37 °C, (b) humedad relativa 100 %, (c) O₂ 10 %, y (d) CO₂ 5 % a 7 %. El experto también puede supervisar el control deseado de la diferenciación de las células animales basándose en criterios convencionales (criterios morfológicos, presencia o ausencia de proteínas superficiales específicas, etc.; véanse también los ensayos del siguiente ejemplo).

Otra forma de realización preferente del método según la invención se refiere al aislamiento y/o al enriquecimiento y/o a la multiplicación selectiva de células madre postembrionarias utilizando un medio que contenga una heparina 2-O-desulfatada, N-desulfatada y/o N-desulfatada y reacetilada. Al mismo tiempo, el cultivo y la conservación de las células madre se realiza de la forma descrita anteriormente o en el siguiente ejemplo.

El experto en la materia puede establecer las concentraciones adecuadas del glicano o el glicosaminoglucuronano modificado para el método de expansión según la invención mediante experimentos más sencillos. En una forma de realización preferente del proceso de expansión según la invención, el glicano o glicosaminoglucuronano modificado está presente en el medio de cultivo en una concentración de 2 a 50 mg/l, siendo 10 mg/ml la concentración más preferente.

Para el método de cultivo según la invención se pueden emplear las siguientes células madre humanas no embrionarias: células madre o progenitoras somáticas, preferentemente, células madre hematopoyéticas. El experto en la materia conoce fuentes adecuadas para obtener y expandir estas células madre. Las células madre hematopoyéticas se pueden obtener de, por ejemplo, hígado fetal, sangre de cordón umbilical o médula ósea, preferentemente para el método según la invención, de sangre de cordón umbilical.

En otra forma de realización preferente del método según la invención se realiza, seguida del cultivo, una comprobación funcional de las propiedades de las células madre y células progenitoras. La invención se explica a continuación mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 - Cultivo de expansión de células progenitoras hematopoyéticas usando heparina modificada como aditivo al medio de cultivo.

Se cultivaron células de sangre de cordón umbilical enriquecidas en células madre durante 5 semanas en un sistema de expansión añadiendo glicanos según la invención con la determinación de la expansión de células progenitoras primitivas tanto mieloides como linfoides como prueba de la multiplicación de células madre (cuantificable como ML-IC; "células iniciadoras de mieloides y linfoides").

El medio de cultivo consistió en "medio de Dulbecco modificado por Iscove" (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) con suero de ternero fetal 12,5 % y suero de caballo 12,5 % (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Para ello se emplearon los glicanos descritos en la Tabla 1, esterilizados con grupos laterales funcionales en una concentración de 20 mg/l y suplementados con los siguientes aditivos: L-glutamina 2 mmol/l (Invitrogen), penicilina (1000 U/ml), estreptomycin 100 U/ml (Invitrogen), hidrocortisona 10⁻⁶ mmol/l, 2-mercaptoetanol-B 25 µM, GM-CSF 10 pg/ml (Immunex Corp., Seattle, WA, EE. UU.), G-CSF 250 pg/ml (Amgen, Thousand Oaks, CA, EE. UU.), SCF 200 pg/ml

(Stem Cell Technologies), LIF 50 pg/ml (Stem Cell Technologies), MIP-1 alpha 200 pg/ml (Stem Cell Technologies) e IL-6 50 pg/ml (Stem Cell Technologies), Flt-3L 10 ng/ml y trombopoyetina 10 ng/ml (Immunex Corp., Seattle, WA, EE. UU.).

5 Los cultivos se obtuvieron pasadas 5 semanas a 37 °C y 5 % de CO₂, con cambio de medio cada 48 horas; a continuación, se determinó la expansión de las células multipotentes equivalentes a las células madre en el ensayo ML-IC (comprobación de LTC-IC y NK-IC).

10 Ensayo ML-IC: Para probar las propiedades de célula madre de las células de la sangre de cordón umbilical cultivadas *ex vivo* se utilizó el ensayo ML-IC (Punzel et al., Blood 93 (1999), 3750-3756). Las células de los cultivos primarios se transportaron uniformemente en la suspensión mediante pipeteo mecánico y, seguidamente, el contenido de cada cultivo primario individual (200 ml) se transportó a 4 nuevos cultivos secundarios ya preestablecidos vinculados al estroma AFT024 (50 ml de suspensión primaria por cultivo secundario), en concreto, de forma que cada uno de los 4 cultivos secundarios de una célula individual primaria se encontrara en la misma posición en las nuevas placas de microtitulación. De esta forma se garantizaba que todos los progenitores secundarios se pudieran asignar a la célula individual primaria. En el proceso, dos de los cultivos secundarios se cultivaron durante 5 semanas en condiciones mieloideas en el ensayo LTC-IC secundario. Los otros dos cultivos se cultivaron en condiciones de diferenciación linfáticas *in vitro* también durante 5 a 7 semanas adicionales en el ensayo LY-IC y, seguidamente, se examinaron en busca de células NK funcionales maduras, como se describe a continuación.

20 Ensayo LTC-IC (Gupta et al., Blood 95 (2000), 147-155.): Las células individuales recién separadas (día 0) o la progenie completa de una célula individual (día 14) se cultivaron en cultivos AFT024 con medio (LTBMC) de cultivo a largo plazo (IMDM/12,5 % FCS/12,5 % suero de caballo, así como penicilina/estreptomomicina e hidrocortisona 10 a 6 mmol) (1 cambio de medio cada 7 días). Después de 5 semanas, el medio se retiró y se añadió medio de metilcelulosa semisólida al cultivo (metilcelulosa 1,12 %, FCS IMDM/30%, eritropoyetina 3IU/ml, sobrenadante con citocina 7,5% de la línea celular 5637 ATCC HB-5). Las células individuales capaces de generar células formadoras de colonias (CFC) secundarias se designaron por definición como LTC-IC.

30 Ensayo LY-IC: Las células individuales recién separadas (día 0) o toda la progenie completa de una célula individual (día 14) se cultivaron en cultivos AFT024 en un medio de diferenciación linfoide (medio DMEM/Ham F 12 2:1 (V/V) con suero AB humano inactivable por calor 20%, así como ácido ascórbico 20 mg/ml, selenio 50 mmol, mercaptoetanol 25 mmol, etanolamina 50 mmol, IL-2 1.000 U/ml, IL-3 5 ng/ml de [solo el día 0], Flt-3L 10 ng/ml, SCF 10 ng/ml e IL-7 20 ng/ml). Después de 5 a 7 semanas, todos los cultivos con proliferación celular clonal visualmente objetivable se recogieron mediante pipeteo mecánico, y se examinaron mediante análisis FACS en busca de células NK maduras (CD56+/CD3-), células NKT (CD3+/CD56+) y células pro-B (CD19+/CD56-).

35 Las células individuales primarias cultivadas capaces de generar tanto LTC-IC como células efectoras linfáticas son entonces células ML-IC equivalentes a células madre. La expansión de las células de la sangre de cordón umbilical se calcula a partir de la relación de LTC-IC inmaduras y NK-IC antes y después del cultivo de expansión. Los resultados de las investigaciones anteriores se representan en la Tabla 1.

TABLA 1

Expansión	H0	H0-1	H1	H2	H3	H3-1	C1	C2
Mieloide	1,0	0,9	3,9	10,7	<u>11,8</u>	<u>4,1</u>	<u>0,3</u>	<u>2,0</u>
Linfoide	<u>1,0</u>	<u>1,1</u>	<u>15,2</u>	<u>11,7</u>	<u>12,4</u>	<u>5,0</u>	<u>7,4</u>	<u>7,7</u>

40 H0: heparina estándar no modificada con bajo volumen de 3-O-sulfato,
H0-1: heparina estándar no modificada con mayor volumen de 3-O-sulfato (heparinas iniciadora para modificaciones regioselectivas);
H1: heparina estándar 2-O-desulfatada de H0;
H2: heparina estándar N-desulfatada de heparina H0;
H3: heparina estándar N-desulfatada y reacetilada de H0;
H3-1: heparina estándar N-desulfatada y reacetilada de H0-1;
45 C1: quitosano N-sulfatado;
C2: quitosano N-desulfatado y N-acetilado.

En las heparinas, el 2-O-sulfato es el grupo sulfato del C2 de la unidad de ácido idurónico, el 3-O-sulfato, el grupo sulfato del C3 de la unidad de glucosamina, el 6-O-sulfato, el grupo sulfato del C6 de la unidad de glucosamina, y el

2-N-sulfato y N-acetato, el grupo N-sulfato y grupo N-acetilo del C2 de la unidad de glucosamina, respectivamente. El peso molecular medio de las heparinas empleadas era de 10 a 12 kDa.

5 Como material iniciador de quitosano se tomó quitosano de cangrejos de FLUKA con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa y se dividió mediante hidrólisis en fragmentos de 29 kDa. Con este quitosano iniciador hidrolizado no se consiguió ninguna expansión de los cultivos de células madre (resultados no mostrados).

10 La verdadera expansión de las células madre se obtiene del aumento combinado de la capacidad de expansión mieloide y linfóide de las CB-HSC manipuladas en las condiciones de expansión descritas anteriormente. En comparación con los cultivos con heparina no modificada (H0 y H0-1), la adición de glicanos modificados regio- y estereoselectivamente muestra un efecto de expansión significativo. Estos resultados ponen de manifiesto que el efecto producido por los glicanos modificados en la expansión de CB-HSC se debe a una desulfatación en el átomo C₂ con reacetilación o acilación.

TABLA 2

Glicano modificado regioselectivamente	2-O-Sulfato	3-O-Sulfato	6-O-Sulfato	2-N-Sulfato	2-N-Acetilo	2-N-CH ₂ -COOH
H0	60 %	5 %	90 %	90 %	7 %	-
H0-1	58 %	33 %	90 %	88 %	5 %	-
H1	9 %	6 %	85 %	90 %	5 %	-
H2	60 %	0 %	85 %	0 %	14 %	-
H3	60 %	5 %	85 %	0 %	100 %	-
H3-1	58 %	33 %	83 %	0 %	100 %	-
C1	-	0 %	70 %	88 %	12 %	38 %
C2	-	0 %	0 %	59 %	41 %*	0 %

15 De la Tabla II se desprende que en las heparinas según la invención en >80 % del polímero total es necesario un grupo 6-O-sulfato en la unidad monomérica de glucosamina. Una O-6-desulfatación selectiva según H. Baumann et al., Carbohydrate Res (1998) 308, 381-388 tiene como resultado una reducción drástica de la actividad funcional de la expansión de las células madre. El grupo 2-O-sulfato de la unidad monomérica de ácido idurónico también contribuye a la actividad y debería estar presente en >60 % del polímero total. Una O-2-desulfatación redujo también significativamente la actividad. El grupo N-sulfato de la unidad monomérica de glucosamina se debe eliminar por completo y sustituir por un grupo N-acetilo o N-acilo de distinta longitud. La N-desulfatación no produce ninguna actividad por sí sola. El grupo 3-O-sulfato de la unidad monomérica de glucosamina debería ser menor o igual al 5% del polímero total. El peso molecular de la heparina modificada es, en un caso ideal, de aproximadamente 10 kDa. Como fuente iniciadora para la producción de heparinas modificadas se puede utilizar heparina procedente de mucosa intestinal o renal porcina o bovina. Como material iniciador para los experimentos sirvió el heparinato de sodio de mucosa porcina, totalmente adecuado para la investigación, actividad 178.000 IU/g (SERVA, Heidelberg, Alemania). Los otros productos químicos eran, salvo indicación contraria, sustancias puras de las empresas Aldrich, Fluka o Sigma.

20

25

Un ejemplo de una heparina modificada funcionalmente activa es una heparina N-desulfatada, N-reacetilada con la siguiente estructura.

Heparina modificada con sulfatación y acetilación modificada

Heparina	2-O-S	3-O-S	6-O-S	C2-N-S	N-Ac	O-Ac	NH ₂
	63 %	5 %	84 %	0 %	100 %	0 %	0 %

La caracterización de los derivados de heparina se realizó mediante espectroscopia RMN-13C a 75 MHz. Las señales se identificaron según B. Casu et al., *Arzneimittelforschung* 33, 135-142, 1983; E. A. Yates et al., *Carbohydrate Res.* 294, 15-27, 1996. La cuantificación de los distintos grupos sulfato se realizó por investigación según Casu et al., *Arzneimittelforschung* 33, 135-142, 1983. Los pesos moleculares se determinaron por cromatografía en columna. Las columnas se calibraron con queratán sulfatos de pesos moleculares definidos [H. Butz et al. *J. Biol. Chem.* 267, 34023408, 1992]. La modificación regioselectiva en el C3 y C6 de la unidad monomérica de glucosamina, la N-acetilación y N-carboximetilación en el C2 de la unidad monomérica de glucosamina se produjeron según Baumann H und Faust V, *Regioselective Modifikationen der Chitosane*, *Carbohydrate Res.* (2001) 331, 43-57.

5
10 *Ejemplo 2 - Elaboración de un agente inmunoterapéutico*

Para una aplicación según las GMP (buenas prácticas de fabricación) se siguieron expandiendo en un cultivo de suspensión células previamente expandidas en las siguientes condiciones:

15 Medio DMEM/Ham 12 2:1 (V/V) cultivado con suero AB humano inactivable por calor 10%, así como con ácido ascórbico 20 mg/ml, selenio 50 µmol/l, mercaptoetanol 25 µmol, etanolamina 50 µmol, IL-2 1000 U/ml, Flt-3L 10 ng/ml, SCF 10 ng/ml, IL-7 20 ng/ml, IL-15 10 ng/ml e IL-21 10ng/ml). Después de 3 a 4 semanas, las células se recogieron mediante pipeteo mecánico y se analizaron mediante un análisis FACS en busca de células NK funcionales maduras de la siguiente forma:

- 20 a) por análisis mediante citometría de flujo de los antígenos superficiales existentes. Al mismo tiempo, las células positivas CD56 (N-CAM) y CD16 (FcR.III), y las negativas CD3 se definieron mediante análisis multicolor como células NK y se analizaron en cuanto a sus receptores activadores y KIR. Estas células eran positivas tanto para receptores KIR específicos CD158 (CD158a (KIR2DL1), b (KIR2DL3)) o CD94/CD159a (NKG2a) como para determinados receptores activadores Nkp, por lo que se garantizaba una actividad celolítica de la célula NK mediante unión en los antígenos I de la clase HLA correspondientes en la célula nativa meta como requisito molecular de la celulolisis.
- 25 b) además, se comprobó directamente la actividad lítica de las células NK generadas a través de un ensayo estándar por liberación de 51Cr en células K562 como células meta. Las células madre multipotentes generadas mediante la adición de varios polisacáridos no mostraron diferencias cuantitativas en cuanto a la expresión de los antígenos superficiales nombrados anteriormente en el desarrollo adicional del cultivo de diferenciación, sino que la única diferencia era apreciable en la cantidad de células expandidas.

30 De forma alternativa, los progenitores ampliados también se pueden madurar *in vivo* mediante la administración subcutánea adicional de IL-2 al paciente (Miller et al., 2005)

De esta forma se dispone de un agente terapéutico celular transfusible de forma intravenosa al paciente como un producto sanguíneo. En el producto celular están contenidas las conocidas células asesinas naturales expandidas o sus progenitores, que en ese momento activan efectos terapéuticos en el paciente. Estos denominados agentes terapéuticos de células asesinas naturales (ATCNK) se pueden aplicar tanto en el contexto de un trasplante de células madre o células de la médula ósea como a modo de agentes terapéuticos independientes para tratar enfermedades malignas de los sistemas sanguíneo y linfático, y todas las demás enfermedades malignas. Otra ventaja de estas células es el paso de la barrera hematoencefálica, lo que permite también el uso en todos los tumores cerebrales malignos.

40 Además, también es posible un uso para el tratamiento de enfermedades virales crónicas (p. ej., hepatitis C y VIH).

Ejemplo 3 - Elaboración y caracterización de heparinas modificadas

Obtención de las heparinas de bajo volumen de 3-O-sulfato mediante cromatografía de afinidad AT III.

45 La antitrombina III (AT III) se une a una secuencia de heparina específica, cuya estructura básica se define como un pentasacárido con un grupo 3-O-sulfato en una glucosamina interna, en la que el grupo sulfato es requisito necesario para la unión de la ATIII (R. Linhard and I. Capila, *Angew. Chemie* 2002, 114, 426-450). Puesto que las heparinas modificadas según la invención presentan una proporción muy reducida de grupos-3-O-sulfato en la unidad monosacárida de glucosamina, se aplicó una cromatografía de afinidad con ATIII a una columna de sefarsa CL4B para obtener heparinas sin capacidad de unión para su modificación química adicional en el desarrollo de AT III. La AT III empleada a estos efectos se aisló de plasma sanguíneo humano.

50 La separación de las heparinas de unión a la AT III de las heparinas sin capacidad de unión a la AT III se controló mediante separación biomagnética. Para ello se fabricaron perlas magnéticas de AT III que separaron, en una columna magnética, la fracción de heparina de unión a la AT III de aquellas sin capacidad de unión a la AT III. La AT III se biotiniló mediante biotina-X-NHS (Calbiochem). Las perlas magnéticas (Dynabeads M-270 Streptavidin; Dynal),

humedecidas con estreptavidina se emplearon en una relación de 1 ml de perlas por 200 mg de biotina ATIII. Después de 30 minutos de incubación en el agitador, las perlas magnéticas se volvieron a aclarar con PBS en la columna magnética para eliminar la biotina y la ATIII no unidas. Así, las perlas magnéticas de ATIII obtenidas de este modo podían aplicarse al ensayo de unión ATIII.

5 *Ensayo de unión AT-III*

10 En el agitador se incubó 1 ml de perlas magnéticas ATIII a temperatura ambiente por cada 1 ml del heparán sulfato que se deseaba examinar durante 30 minutos. La mezcla se depositó en un soporte magnético, el sobrenadante con la porción no unida del heparán sulfato se retiró y la concentración de heparán sulfato se determinó por fotometría en 232 nm; para ello se crearon previamente curvas de calibración para cada heparina. La porción sobrante, unida a las perlas magnéticas de ATIII, se incubó entonces en el agitador durante 10 minutos con 2M NaCl y, de esta forma, se deshizo la unión de ATIII. En este momento se volvió a retirar del soporte magnético el sobrenadante con el heparán sulfato que se había unido a la ATIII en la primera etapa. Su concentración se determinó fonométricamente en 232 nm mediante la curva de calibración.

15 Las heparinas pobres en 3-O-sulfato obtenidas de esta forma se modificaron luego parcial o totalmente según métodos establecidos; véase Nagasawa K et al., Glucosamin N-desulfation, Carbohydrate Res. (1977) 58, 47-55; Danishefsky, I et al., Glucosamin N-reacetylation, Arch Biochem Biophys (1960) 90, 114-121; M.Höök et al., Glucosamin N-desulfation, Anal Biochem. (1982) 119, 236-245, y lo descrito anteriormente en el Ejemplo 2.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para obtener y expandir células madre hematopoyéticas postembrionarias de sangre de cordón umbilical evitando una diferenciación no deseada, en el que las células madre aisladas de la sangre de cordón umbilical se cultivan *ex vivo* en un medio sin estroma en presencia de un glicano y/o un glicosaminoglucuronano regiomodificado, que es modificado de la siguiente forma: el grupo lateral del átomo C₂ de una o varias unidades monoméricas de glicano y/o glicosaminoglucuronano presenta un grupo acetilo o un grupo acilo; el grupo lateral del átomo C₆ de una o varias unidades monoméricas de glicano y/o glicosaminoglucuronano es un grupo 6-O-sulfato y obteniendo células madre y células progenitoras generadas que pueden diferenciarse en células mieloides y linfoides de forma selectiva.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el glicano o el glicosaminoglucuronano regiomodificado se selecciona de entre: α 1-4-glicanos, β 1-3-glicanos, β 1-4-glicanos, β 1-3, β 1-4-glicosaminoglucuronanos, β 1-4, α 1-4-glicosaminoglucuronanos y β 1-4, β 1-3, (α 1-3)-glicosaminoglucuronanos.
3. Método según una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el glicano o glicosaminoglucuronano regiomodificado se encuentra en el medio en una concentración de 15 a 50 mg/L.
- 15 4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las propiedades de las células madre se controlan en un ensayo ML-IC.
5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células madre y las células progenitoras multiplicadas se diferencian en linfocitos funcionales (células NK y células NKT).
- 20 6. Medio de cultivo para la expansión de células madre y células progenitoras postembrionarias, caracterizado por que comprende un glicano y/o glicosaminoglucuronano regiomodificado, en el que el grupo lateral del átomo C₂ de una o más unidades monoméricas del glicano y/o glicosaminoglucuronano está acilado o acetilado, y el grupo lateral del átomo C₆ de una o más unidades monoméricas del glicano y/o glicosaminoglucuronano es un grupo 6-O-sulfato.
- 25 7. Uso de glicanos y glicosaminoglucuronanos regiomodificados, en el que el grupo lateral del átomo C₂ de una o más unidades monoméricas del glicano y/o glicosaminoglucuronano está acilada o acetilada, y el grupo lateral del átomo C₆ de una o más unidades monoméricas del glicano y/o glicosaminoglucuronano tiene un grupo 6-O-sulfato, para expandir las células madre y las células progenitoras postembrionarias.